

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580396

研究課題名(和文)ウシ体細胞クローンに用いるドナー細胞の簡易保存とくに凍結乾燥保存法の開発

研究課題名(英文)Development of simple storage methods for donor cells such as freeze-drying for bovine somatic cell nuclear transfer

研究代表者

佐伯 和弘 (SAEKI, Kazuhiro)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10298937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：クローンウシ生産に利用可能な細胞の簡易保存方法について検討した。まず、簡易凍結保存を検討した。ウシの種々の組織を、-20、-80 および-196 で凍結保存し生存細胞の取得を試みた。その結果、-80 では6ヶ月保存しても、耳介などから培養細胞が得られた。

次に凍結乾燥保存を試みた。子牛耳介由来培養細胞を用い、トレハロース導入は、digitoninによる膜透過処理により行った。凍結乾燥後、細胞核DNAの断片化状態をComet assayにより検討した。その結果、10あるいは20 µg/ml のdigitonin濃度で0.4Mトレハロースで核DNAの断片化が少なく、生存細胞と差が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Simple storage methods for donor cells used for somatic cell nuclear transfer were examined. First, we examined whether live cells can be retrieved from simple frozen tissues. Bovine several tissues were frozen at -20 °C, -80 °C and -196 °C. After thawing tissues, live cells were obtained from ear tissues frozen at -80 °C even after 6 months. Next, nuclear status of somatic cells after freeze-drying was examined. Trehalose was introduced into cells taken from ear tissues by digitonin, then the cells were freeze-dried. Fragmentation of nuclear DNA was examined by a Comet assay method. DNA fragmentation of freeze-dried cells treated with 0 or 20 µg/ml digitonin and 0.4M trehalose was similar to that of untreated live cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：ウシ 体細胞クローン ドナー細胞 簡易保存 簡易凍結 凍結乾燥 トレハロース

### 1. 研究開始当初の背景

2010年に宮崎県で発生した口蹄疫は県内のウシやブタの約1/4が殺処分となる甚大な被害をもたらした。クローン動物は同一の遺伝形質を持つ個体であることから、このような海外悪性伝染病からの遺伝的バックアップになりうる。

一般に、臓器や組織が適切な凍結保護処理を行わずに凍結されていた場合、細胞膜や核が氷晶によって物理的に損傷し細胞は死滅しているとされている (Meryman, in Cryobiology, 1966)。しかし、最近、我々は、耐凍剤を一切用いず10年間にわたり-80℃で冷凍保存されていたウシの精巣組織に全く正常な生存細胞が存在していることを見出し、体細胞クローン技術でかつての名牛「安福号」を再生したことを報告した (Hoshino et al, PLoS ONE, 2009)。さらに、最近、個体からの採取がより容易な脂肪組織の小片をそのまま凍結したところ全てのサンプルから培養細胞を取得でき、組織の簡易保存方法として利用できることを実証している (佐伯ら特願 2008-267648, 2008, Hoshino & Saeki, J Mom Ova Res, 2010)。ここでは、さらに採取が容易な耳介の一部などの簡易凍結とそれら組織からの細胞採取についても検討する。

Wakayama et al (PNAS, 2008)は、-20℃で16年間も冷凍保存されたマウスの死体の死滅細胞の核からもクローン動物が生産できることを実証している。このことは細胞から完全なゲノムを取り出すことさえできれば、いままで行われている凍結保存方法で細胞の増殖性を維持できなくてもクローン技術によって動物個体を復活できる可能性を示している。このことから、次に、細胞の凍結乾燥保存を考えた。凍結乾燥は、行程は煩雑であるが、保存が常温あるいは冷蔵程度で可能となり、管理が容易であるし保存コストが極めて低廉となる。

ヒツジ (Loi et al, PLoS ONE, 2008)においては、細胞の凍結乾燥時にトレハロースを添加するとクローン胚が胚盤胞へ発生することが報告されている。しかし、トレハロースは2糖類であるので培地に添加しても一般の細胞では細胞内に導入されない。トレハロースを直接注入することで凍結融解後高い発生率が得られている (Eroglu et al, Fertil Steril, 2002, Menze et al, Biol Reprod, 2009)。体細胞では、トレハロース合成酵素遺伝子導入 (Guo et al, Nat Biotechnol, 2000)、ヘモリジン (Eroglu et al, Nat Biotech, 2000) や超音波による細胞膜穿孔 (Zhang et al, Cryobiology, 2009)、リポソーム (Holovati et al, Cryobiology, 2009) やナノ粒子 (Zhang et al, Nanotechnology, 2009) 包埋などにより細胞内に導入する方法が考案されている。本研究ではウシ体細胞へのトレハロースの導入方法を検討し、凍結乾燥後の細胞が蘇生されるのか、あるいは蘇

生しなくても復水後の細胞を用いてクローン胚を作製し、細胞の核の状態を検討する。

### 2. 研究の目的

一般に体細胞クローン動物作製に用いる細胞は生存個体から取得されているが、近年、冷凍庫に長期間投入しただけの臓器や個体からクローンウシやマウスが作成されている (Hoshino et al, 2009, Wakayama et al, 2008)。簡易に保存した細胞や臓器からクローン動物が作成できれば、本年宮崎県で発生した口蹄疫のような海外悪性伝染病の流行による甚大な畜産被害とくに遺伝的な被害のバックアップとして利用できると考えた。ここでは体細胞クローン動物の生産が可能な体細胞の簡易凍結方法と凍結乾燥保存法について検討した。また、冷蔵保存組織として市販されている牛肉から体細胞を得て、クローン胚の作製が可能かどうかについても検討を加えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウシ組織の簡易凍結

と殺された3頭の子ウシから耳介、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳、胸骨頭筋下顎部、半膜様筋、皮下脂肪、筋間脂肪、大腿骨を採取した。これら組織を生理食塩水にて洗浄後、氷温にて研究室に持ち帰った。

解剖ハサミ、メス、8mm径生検トレパン (カインダストリス BP L80K) および鋸を用いて各組織を約1-2gに切り分け、Cryo tube (Nunc 366656) に投入した。骨は硬骨組織と骨髓組織に分離し、それぞれ採取した。全ての組織をCryo tubeに入れた後、-20℃、-80℃ および液体窒素中に投入し、凍結保存した。保存期間は1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月とした。

凍結した組織を、37-39℃の生理食塩水 (大塚製薬 1758) に5min入れて融解し、各組織を細切した。細切した組織は、0.2% Dispase 0.1% Collagenase で消化した後、10%D-MEM+primocin で懸濁し、細胞培養用dishに播種し、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 95%airで培養した。10日間培養し、細胞の定着および増殖を観察した。

#### (2) 市販牛肉からの体細胞の獲得とクローン胚の作製

すでに屠殺後1週間程度までの市販牛肉からは生存細胞が得られ、これら細胞でクローン胚が生産できることを報告している (谷口ら、第16回日胚、出雲市、2009)。ここでは生存細胞が得られていない10日以上経過した市販牛肉から細胞を得てクローン胚が生産できるか検討した。

牛肉を精肉店で購入し、個体識別番号からその屠殺日を調べた。筋肉と脂肪組織にわけ、細切後、0.2% Dispase および0.1% Collagenase で消化し、細胞を単離し、10%D-MEM+primocin で懸濁した後、細胞培養用dishに播種し、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 95%airで培養

した。10日間培養し、細胞の定着および増殖を観察した。

細胞懸濁液には多くの赤血球が含まれていたため、ACK Lysing Buffer で溶血処理をした。これら細胞の核のDNAの断片化の状態をTUNEL assayで調べた。また得られた細胞で体細胞クローン胚を作製し、胚盤胞への発生を調べた。

### (3)細胞の凍結乾燥保存方法の検討

ほ乳類細胞を完全な細胞核DNAを維持したまま凍結乾燥を行うことは、乾燥ストレスなどにより極めて困難である。一方で、自然界にはネムリユスリカやクマムシといった、乾季になると脱水することでアンヒドロピオシス(乾眠)という乾燥状態になり、乾燥に耐える生物があり、この状態の生物は乾燥だけではなく、低温や高温など様々な環境ストレスに耐性を持つことが示されている(黄川田, 2009)。これらの動物は細胞内のトレハロース濃度が高まることにより、乾燥状態での生存性に大きく寄与していることが知られている。近年では、トレハロースを添加することで、生存性を維持したままヒト単核細胞を凍結乾燥できたとの報告もある(Natan, et al, 2009)。ここでは、体細胞核移植に利用可能なドナー細胞の凍結乾燥保存方法を検討した。

## 4. 研究成果

### (1)ウシ組織の簡易凍結

-20 保存区では、培養可能な細胞は、耳介および肺から最長でも1週間保存でしか得られなかった(表1)。

-80 保存区では、最長で6ヶ月保存した耳介、肺および筋間脂肪から細胞を得ることが出来た(表2)。

-196 保存区では、最長でも1週間保存した耳介、肺および筋間脂肪からしか培養可能な細胞は、得られなかった(表3)。

表1. -20 で保存したウシ組織から培養可能な細胞が得られた回数

組織	対照区	1週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
耳介	3	2	0	0	0
肺	3	2	0	0	0
筋間脂肪	3	0	0	0	0
皮下脂肪	3	0	0	0	0
脾臓	3	0	0	0	0
腎臓	3	0	0	0	0
棘突起骨髄	2	0	0	0	0
棘突起硬骨	1	0	0	0	0
脳	3	0	0	0	0
胸骨下顎筋	3	0	0	0	0
半膜様筋	3	0	0	0	0
大腿骨骨髄	3	0	0	0	0
心臓	2	0	0	0	0
肝臓	1	0	0	0	0
大腿骨硬骨	0	0	0	0	0

保存期間0-1ヶ月まではn=3

保存期間3ヶ月以降はn=1

表2. -80 で保存したウシ組織から培養可能な細胞が得られた回数

組織	対照区	1週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
耳介	3	3	3	1	1
肺	3	2	2	0	1
筋間脂肪	3	1	3	1	1
皮下脂肪	3	2	1	0	0
脾臓	3	1	1	0	0
腎臓	3	1	0	0	0
棘突起骨髄	2	1	0	0	0
棘突起硬骨	1	1	0	0	0
脳	3	0	0	0	0
胸骨下顎筋	3	0	0	0	0
半膜様筋	3	0	0	0	0
大腿骨骨髄	3	0	0	0	0
心臓	2	0	0	0	0
肝臓	1	0	0	0	0
大腿骨硬骨	0	0	0	0	0

保存期間0-1ヶ月まではn=3

保存期間3ヶ月以降はn=1

表3. -196 で保存したウシ組織から培養可能な細胞が得られた回数

実験区	対照区	1週間	1ヶ月	3ヶ月	6ヶ月
耳介	3	1	0	0	0
肺	3	1	0	0	0
筋間脂肪	3	1	0	0	0
皮下脂肪	3	0	0	0	0
脾臓	3	0	0	0	0
腎臓	3	0	0	0	0
棘突起骨髄	2	0	0	0	0
棘突起硬骨	1	0	0	0	0
脳	3	0	0	0	0
胸骨下顎筋	3	0	0	0	0
半膜様筋	3	0	0	0	0
大腿骨骨髄	3	0	0	0	0
心臓	2	0	0	0	0
肝臓	1	0	0	0	0
大腿骨硬骨	0	0	0	0	0

保存期間0-1ヶ月まではn=3

保存期間3ヶ月以降はn=1

これらのことから、何ら耐凍剤を添加しなくても凍結保存した組織からの培養可能な生存細胞の取得ができ、特に-80 で保存した場合には、耳介、肺および脂肪組織であれば6ヶ月と長期間であっても培養細胞が得られることが示された。

### (2)市販牛肉からの体細胞の獲得とクローン胚の作製

屠殺後13及び21日の牛肉の筋肉および脂肪組織からクローン胚作製に利用可能な単核の体細胞の取得が可能かどうか検討した。その結果、単核の細胞は脂肪組織からしか得られなかった。それら細胞を培養したが

増殖は見られなかった。そこで、得られた増殖能のない細胞でも体細胞クローン胚の作製ができないかを検討した。屠殺後 13-24 日後の市販の牛肉の脂肪組織から得られた細胞懸濁液には赤血球が多く含まれていたため ACK Lysing Buffer で溶血処理をした。得られた細胞の核の DNA の断片化の状態を TUNEL assay で調べたところ、DNA が断片化した細胞の割合は 3-17% と培養細胞(4%) と同等 ( $P>0.05$ ) で非常に低率だった。このことから、牛肉脂肪組織から得た細胞は培養しても増殖できないものの、細胞膜は正常で核も断片化していないことがわかった。

これら細胞を用いて体細胞クローン胚を作製した。その結果、胚盤胞への発生率は、15% と対照区の 41% より低い ( $P<0.05$ ) ものの正常に発生する胚が得られた。

表 4. 牛肉脂肪組織から得た細胞によるウシ SCNT 胚の初期発生

実験区	核移植胚数	融合胚数 (%)	培養胚数	卵割胚数 (%)	胚盤胞数 (%)
線維芽細胞 (control)	182	140(77) <sup>a</sup>	128	75(59)	31(41) <sup>a</sup>
牛肉由来細胞	189	98(52) <sup>b</sup>	86	33(38)	5(15) <sup>b</sup>

異符号間に有意差あり ( $P<0.05$ )

### (3)細胞の凍結乾燥保存方法の検討

トレハロースを含有する培地に細胞を導入して凍結乾燥する手法がしばしば利用されているが、トレハロースは分子量が大きいため、細胞膜を透過することができない。このことから、本研究では、まず、細胞質へトレハロースを半自動微量薬液注入装置であるトランスジェクターを用いて個々の培養細胞に直接注入を行ったが極めて少数の細胞にしか注入できず、その後の凍結乾燥にまで至らなかった。このため、次に、界面活性剤である digitonin を用いた細胞膜の穿孔を検討した。本研究では、凍結に耐性のある耳介由来の繊維芽細胞を用い、凍結乾燥後に細胞核 DNA の損傷が最小となるトレハロースと digitonin の濃度の組合せを Comet assay を用いて検討した。

0, 20, 30 および 40  $\mu\text{g/ml}$  の digitonin 濃度で 0.4 および 0.6M トレハロースの組合せで凍結乾燥を行った細胞をコメットアッセイにより細胞核 DNA の断片化の状態を調べた。表 5 より、いずれの区画も生存細胞と比べ tail%DNA の値が著しく高く、核 DNA が断片化していたことが分かった (表 5)。

このため、次に、より低濃度のトレハロースと digitonin の組合せでの検討を行った。

10 および 20  $\mu\text{g/ml}$  の digitonin 濃度で 0.2 および 0.4M トレハロース濃度で凍結乾燥を行った細胞をコメットアッセイし DNA の断片化を調べた。表 6 の通り、トレハロース 0.2M で 10 および 20  $\mu\text{g/ml}$  digitonin 濃度で凍結乾燥を行った細胞では、いずれも著しい核

DNA の断片化が見られたが、0.4M トレハロースで 10 および 20  $\mu\text{g/ml}$  digitonin 濃度で凍結乾燥を行った細胞では、いずれも生存細胞と tail%DNA の値で有意な差は見られず ( $P>0.05$ )、ほとんど DNA の断片化が起きていないと思われた。

表 5. 凍結乾燥したウシ繊維芽細胞の DNA 断片化

トレハロース(M)	digitonin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cometの長さ	tail %DNA	tail moment
0.4M	0	148.3	41.3 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	40.5
	30	142.9	38.2 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	35.1
	40	162.7	41.0 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	48.1
0.6M	0	150.9	41.9 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	42.7
	20	139.7	34.0 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	30.5
	30	136.4	33.9 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	28.0
	40	155.0	37.8 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	40.0
生存細胞		120.7	12.2 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	9.9
過酸化水素処理細胞		157.7	37.9 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	38.6

異符号間に有意差あり ( $P<0.05$ )。

表 6. 凍結乾燥したウシ繊維芽細胞の DNA 断片化

トレハロース (M)	digitonin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cometの長さ	tail %DNA	tail moment
0.2M	10	131.6	34.9 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	33.6
	20	135.0	38.1 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	34.3
0.4M	10	101.9	21.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	12.1
	20	100.6	20.0 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	11.9
生存細胞		85.1	15.1 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	7.3
過酸化水素処理細胞		133.2	35.5 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	29.4

異符号間に有意差あり ( $P<0.05$ )。

以上より、ウシの耳介、肺および脂肪組織であれば、耐凍剤を添加しないで -80 で簡易凍結することで、長期間生存細胞を保存できることが示された。また、凍結していない市販の牛肉からも培養はできないものの核 DNA に断片化が見られない体細胞が獲得でき、核移植することでクローン胚に発生することも明らかになった。凍結乾燥保存では、digitonin にてトレハロースを細胞質内に導入することで無処理の細胞と同レベルの核 DNA の断片化となることが示された。今後、体細胞クローン胚を作製しその生存性を検討したい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Saeki K, Iwamoto D, Taniguchi S, Kishi M, Kato N. Maturation of bovine oocytes in poly(dimethylsiloxane) microwells and their subsequent development following in vitro

fertilization. 40th Annual Conference of the International EmbryoTransfer Society, Reno, Nevada. January 11-14, 2014.

岩本太作, 谷口俊仁, 岸昌生, 加藤暢宏, 佐伯和弘. ポリジメチルシロキサン製マイクロウェルを用いたウシ卵子の成熟培養. 第 20 回日本胚移植研究会合同研究発表大会 (北海道大学学術交流会館、札幌市、8/12-12, 2013)

Saeki K, Taniguchi S, Iwamoto D, Kishi M, Sho J. Production of embryos cloned from beef purchased at the market, the 17th International Congress on Animal Reproduction, Vancouver Convention Centre, Vancouver, British Columbia, Canada on July 29 - Aug. 2, 2012.

庄隼生, 岩本太作, 岸昌生, 佐伯和弘. 市販の牛肉から獲得した非培養細胞によるクローン胚の作製. 第 104 回日本繁殖生物学会大会. いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡市. 2011 年 9 月 15 ~ 17 日

〔図書〕(計 1 件)

Saeki K, Hoshino Y, Taniguchi S. Biological Age of Cloned Animals. In: Wilmut I, Jaenisch R, Gurdon J, Lanza R, West M, Campbell KHS (eds.), Principles of Cloning, 2nd Edition, Elsevier Academic Press, 419-428, Oct, 2013.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐伯 和弘 (SAEKI, Kazuhiro)  
近畿大学・生物理工学部・教授  
研究者番号: 1 0 2 9 8 9 3 7

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし